



TITLE:

ニホンザル肝細胞膜に存在する酸性プロテアーゼの生理機能(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

森山, 昭彦

CITATION:

森山, 昭彦. ニホンザル肝細胞膜に存在する酸性プロテアーゼの生理機能(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1989, 19: 58-59

ISSUE DATE:

1989-09-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/163909>

RIGHT:

有するとみなすことができた。

テナガザルは2つのC α 遺伝子を有するが、そのうち一方のヒンジ領域はヒト及びアフリカ産類人猿のC α 2遺伝子と同じタイプ即ち、15塩基ユニットがイントロン部分を含めて2回繰り返した構造を有するとみなすことができた。そこでこのC α 遺伝子をC α 2遺伝子と呼び、他方をC α 1遺伝子と呼ぶことにした。C α 1遺伝子ヒンジ領域はC α 2タイプの15塩基リピートの間に、エクソンの15塩基ユニット中の9塩基が重複して入りこんだ構造をしていた。

カニクイザルC α 遺伝子のヒンジ領域は15塩基ユニットの繰り返し構造を有さず、長さがヒト上科のどれとも異なっていた。

旧世界ザルにおいてはヒト上科とは独立した、しかも点突然変異以外のイベントがC α 遺伝子ヒンジ領域に生じたと考えられる。ヒト上科においてもこの領域に重複や欠失が繰り返し生じてきたと考えられる。平成元年度の共同利用研究では、類人猿と旧世界ザルのC α 遺伝子の全塩基配列を決定し、遺伝子重複の生じた時期を明らかにし、その上でヒンジ領域に生じた重複や欠失の時期を明らかにしていく予定である。

課 題 13

新生直後の霊長類幼体における長鎖不飽和脂肪酸合成酵素活性に関する研究

藤本健四郎・金沢文子（東北大・農）

n-3系の長鎖ポリエン酸であるドコサヘキサエン酸は、脳および網膜などの神経系膜組織に多く含まれる。前年度研究では、ニホンザル初乳の脂質組成がヒトのそれに近似していること、ドコサヘキサエン酸が乳脂脂肪酸の2%を占めることを明らかにし、乳仔の場合、ドコサヘキサエン酸の外部からの供給が不可欠であることを予想した。そこで、本年度は、ニホンザル新生児、幼若獣、成獣（各一例）の大脳皮質の長鎖高度不飽和脂肪酸合成能を比較するために実験を行った。大脳皮質より調製したミクロソームを¹⁴C-リノール酸、リノレン酸またはエイコサペンタエン酸を含む反応液に添加し、37°C、20分間のインキュベーションを行った。反応後、抽出した脂肪酸をメタノリシスし、HPLCで分画し、各脂肪酸の放射活性

を測定した。その結果、幼若獣でかなり高い活性を認めたが、新生児および成獣では脂肪酸合成能が弱いことを認め、加齢による影響があることが強く示唆された。肝臓での実験では鎖長伸長生成物（18:2→20:2、18:3→20:3、20:5→22:5）が特徴的に多かったが、大脳皮質では特に多くの鎖長伸長物の誘導は認められず、むしろ不飽和化産物（18:2→20:4、18:3→22:6、20:5→22:6）が多かった。また、前頭前野、側頭野、視覚野の脂質分析をしたところ、ドコサヘキサエン酸含量は視覚野で最も多かったが、脂肪酸合成能に差異を認めなかった。

また、カニクイザル成獣一例、胎生150日三例の肝臓について同様の実験を行ったところ、胎児の肝臓に成獣の場合と同程度の脂肪酸合成力があることを認めた。すでに胎生150日では、肝臓が生体膜の構成成分であるドコサヘキサエン酸の供給源のひとつとして役割を果たしていると考えられる。

今後、さらに例数を増やし、加齢と脂質代謝との兼ね合い、特に成長期と老化について明らかにしていきたい。

ニホンザル肝細胞膜に存在する酸性プロテアーゼの生理機能

森山昭彦（名古屋市大）

従来から知られている動物組織の酸性プロテアーゼは、赤血球膜結合性酸性プロテアーゼを除いてすべて可溶性の酵素である。しかしながら、組織抽出液を超遠心により分画すると、膜を含む沈殿画分にもある程度の酸性プロテアーゼ活性の存在することが知られている。ニホンザルは、既に胃ペプシノーゲン類、肺カタペシンD、および肺と前立腺のペプシノーゲン様酸性プロテアーゼ前駆体などの性質が明らかにされており、酸性プロテアーゼについては最も研究の進んでいる動物である。また、ニホンザルの諸臓器を用いた予備実験により、肝臓抽出液不溶性画分に比較的強い酸性プロテアーゼ活性が見い出された。そこで、本研究ではニホンザル肝より、膜結合型酸性プロテアーゼを精製し、その性質を調べた。活性は酸変性ヘモグロビンを基質とし、pH4.0で測定した。

肝臓粗抽出液を超遠心により分画すると、酸性プロテアーゼ活性の35%が膜画分に回収された。

この活性は高濃度の塩の添加では可溶化されず、1%トリトンX-100により可溶化された。また一度可溶化された酵素は、以後トリトンX-100を除去しても可溶性であった。可溶化後、DEAE-セファセル、ブチルトヨパール、セファクリルS-300、DEAE-トヨパールカラムを併用し、本酵素を精製した。精製酵素はゲル濾過法で約42,000の分子量を与え、ヘモグロビンに対する至適pH、ペプスタチンに対する感受性等の諸性質は、カテプシンDのそれとよい一致を示した。同様の酵素はヒト肝臓にも存在し、ニホンザルの場合同様、カテプシンDと著しい類似性を示した。カテプシンDを精製し詳細な性質を比較しなければ断定できないが、両酵素は同一の可能性が高い。なお、本酵素の膜への親和性の機構や生理的意義については、今後さらに検討の必要がある。

B. 自由研究

バルブアルブミンよりみた霊長類骨格筋の特性

田之倉 優 (順天堂大・医)
浅岡一雄 (京大・霊長研)

バルブアルブミンは、脊椎動物の骨格筋に広く分布する低分子量のカルシウム結合蛋白質で、筋収縮において弛緩因子として機能することが示唆されている。魚類や両生類の速筋に大量に含まれるが、最近では哺乳類の骨格筋や神経、分泌線にも存在することが分ってきた。霊長類については、ニホンザルの筋肉より精製可能であり、コイやカエル等とは異なる isoform が存在することが、これまでの研究で分っている。本研究では、バルブアルブミンからみた霊長類骨格筋の特徴を明らかにするために、サル骨格筋からバルブアルブミンを単離精製し、性質を調べた。

バルブアルブミンは、ニホンザルの骨格筋からトリクロロ酢酸 (TCA) 法で抽出した粗標品を、ゲル濾過とイオン交換クロマトグラフィーにより精製して、SDS 電気泳動で単一のバンドを与える標品を得た。この70nmol を用いてバルブアルブミンのN末端アミノ酸配列を調べた。気相エドマン法を用いて6番目までのPTH 標識アミノ酸を同定したが、いずれも検出されず、ニホンザルのバルブアルブミンはN末端がブロックされてい

ることが分った。また、ニホンザルの骨格筋からカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) を精製し、バルブアルブミンの反応性を解析した。CANP は、ニホンザル骨格筋の抽出液より DEAE イオン交換、AcA44ゲル濾過、フェニルセファロース吸着クロマトグラフィーを用いて精製した。ニホンザル骨格筋には CANP は、m、 μ カルシウム反応型の順に多く存在し、また家兎などと比べ、 μ 型に富んでいた。精製 CANP をカルシウム存在下でバルブアルブミンに反応させた。反応進行は HPLC を用いて調べた。pH7.5、30℃の条件下で30分以内に数本のペプチドが出現し、切断が起きることが分った。得られたペプチドの解析から、バルブアルブミンは CANP によりヘリックス末端部で消化されていることが示された。以上のことは、生体内におけるバルブアルブミンの代謝回転の様式を表していると考えられる。

霊長類の社会的行動にかんする実験的分析

日上耕司 (関西学院大・文)

1. ニホンザル集団場面における回避行動の伝播
何らかの危険を避ける行動が個体間で伝播することを実験的に示した研究例は極めて少ない。'85、'87年度の2個体場面での実験的分析に引き続き、集団場面において、特定の対象物を避ける行動が伝播するのかどうかについての基礎的研究として、ニホンザル放飼群に対して比較的新奇な対象物をいくつか呈示し、各個体がどのような接近・接触反応を示すかについて実験・観察を行なった。対象としたのは嵐山群 (0歳: 8頭、1~2歳: 8頭、3~4歳: 7頭、5~6歳: 7頭、7~10歳: 7頭、11歳以上: 10頭) であった。観察は1日1回80分間行ない、接近・接触反応の有無、反応個体を30秒毎に記録した。一般的傾向として、終始高頻度で反応を示したのは1~2歳の個体であった。0歳児の反応は呈示初日にはあまりなく、2日目以降に急増し、以後1~2歳児と同程度の高反応率を示した。累積反応個体数は3~4日で頭打ちとなり、7歳以上の個体はほとんど反応を示さなかった。また、母子、兄弟、同年齢の遊び仲間などの間で顕著な反応同期性がみられた。以上を通じて、新奇な対象物が群れの中に受け入れられていく際の基本的なプロセスを数量的分析に基づいて明らかにすることができた。